

Стандартная операционная процедура
«Тестирование клеток мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР»

Составлено: Т.А. Шнайдер, м.н.с., А.Г. Мензоров, к.б.н., в.н.с.

Содержание и назначение: Определяет протокол тестирования клеток мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) экспрессируют гены, которые можно использовать как маркеры плюрипотентности.

Эмбрионидные тельца (ЭТ) – это сферические агрегаты, образуемые ПСК при культивировании в суспензионной культуре и имитирующие предимплантационную стадию развития эмбриона *in vitro*. В процессе культивирования ПСК в виде ЭТ, в них происходит экспрессия молекулярных маркеров, специфичных для трех зародышевых листков. Таким образом, формирование ЭТ, с их последующим анализом, являются общепризнанным методическим подходом для исследования клеток на плюрипотентность.

В настоящей СОП описан подробный оптимизированный протокол тестирования клеток мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Тестирование клеток мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР» разработан в качестве стандарта для обеспечения контроля контаминации клеточных линий человека и животных для ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации протокола тестирования клеток мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР.

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с культурами клеток человека и животных.

В ходе работы мы руководствовались: правилами лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н) и ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ. 2010. 12 с.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности,

проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Оборудование и материалы

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов:

Лабораторное оборудование (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования)

Для большей части оборудования ниже не указан производитель, так как можно использовать приборы разных производителей. Криоконтейнер также можно заменить на аналогичный.

- Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот.
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Центрифуга-вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.
- Центрифуга с охлаждением и ротором для пробирок на 1,5 мл.
- Холодильники на -80°C , -20°C и $+4^{\circ}\text{C}$.
- Камера для горизонтального электрофореза.
- Столик для выравнивания агарозного геля.
- Спектрофотометр для измерения концентрации нуклеиновых кислот Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).
- Гель-документирующая система BioRad ChemiDoc MP (BioRad).
- Металлический держатель для пробирок на 200 и 500 мкл.
- Лед.
- Термоконтэйнер (в том числе пенопластовые коробки).
- Микроволновая печь.
- Весы.
- Химическая стеклянная колба (термостойкая).

Расходные материалы и реактивы (приведены возможные варианты производителей материалов и реактивов)

Указанные ниже реагенты можно заменять на аналогичные от других производителей, поэтому, например, для части пластиковых расходных материалов производитель не указан.

- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Набор для ПЦР БиоМастер HS-Тaq ПЦР-color (2X) (Биолабмикс, МНС010-1020).
- Праймеры (Биосет).
- Набор реагентов RevertAid™ RT Kit для синтеза первой цепи кДНК (Thermo Fisher Scientific, K1691)
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл.
- Тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 200 и 500 мкл.
- Реагент для выделения РНК TRI Reagent (Sigma-Aldrich, T9424).
- Изопропанол.
- Хлороформ.
- 70 % этанол.
- Трис.
- ЭДТА.
- Уксусная кислота (ледяная).
- Деионизированная вода.
- Агароза.
- Бромистый этидий.
- ДНК-маркер 100–1500 п.о.
- ПСК и ЭТ мыши.

Подготовка материалов

- Клеточный материал: перед выделением РНК из ПСК или ЭТ промыть их в НФБ, переместить в 1,5 мл пробирку, центрифугировать 5 мин на 1500 об/мин и удалить супернатант. Полученный клеточный осадок можно хранить на –80 °С.
- 50X ТАЕ буфер: Трис – 24,22 г, ЭДТА – 1,862 г, уксусная кислота (ледяная) – 8,96 мл, деионизированная вода – 73,3 мл (для приготовления 100 мл раствора). Для получения рабочей концентрации 50X буфер необходимо развести в деионизированной воде 1:49.
- Агарозный гель для проведения электрофореза ДНК: взвесить 3 г агарозы и растворить в 100 мл ×1 буфера ТАЕ, нагревая раствор в микроволновой печи. Добавить раствор

бромистого этидия до рабочей концентрации 5 мкг/мл. Залить в столик для выравнивания геля и поместить лопатки для формирования карманов.

Тестирование клеток мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР

Выделение РНК

1) Лизировать ЭТ в 1 мл TRI Reagent, тщательно пропипетировать. Оставить на 5 мин при комнатной температуре.

2) Добавить 200 мкл хлороформа, перемешать и инкубировать 10 мин при комнатной температуре.

3) Центрифугировать образцы 15 мин при 4 °С и 12000 g. Смесь должна разделиться на 3 фазы: красную органическую (содержащую белки), промежуточную фазу (содержащую ДНК) и бесцветную водную фазу (содержащую РНК).

4) Перенести в новую пробирку водную фазу, содержащую РНК. Добавить 500 мкл изопропанола, перемешать и инкубировать 10 мин при комнатной температуре.

5) Осадить РНК центрифугированием в течение 10 мин при 12000 g и 4 °С. Удалить супернатант.

6) Промыть полученный осадок РНК 1 мл 70 % этанола. Центрифугировать 5 мин при 7000 g и 4 °С. Убрать супернатант.

7) Просушить осадок РНК при комнатной температуре в течение 10 мин и растворить в небольшом объеме воды (30–50 мкл). Измерить концентрацию РНК в образцах на спектрофотометре (согласно инструкциям производителя). Полученные растворы РНК могут храниться при –80 °С.

Синтез кДНК

Данный этап работы выполняется при помощи набора реагентов RevertAid™ RT Kit (Thermo Fisher Scientific).

8) Обработать дезоксирибонуклеазой I (ДНКазы I) образцы с РНК для удаления возможных примесей геномной ДНК. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты: 1 мкл 10X реакционного буфера для ДНКазы, 1 мкл ДНКазы I, 1 мкг РНК и довести стерильной водой, не содержащей нуклеаз, до конечного объема 10 мкл. Инкубировать 30 мин при 37 °С.

9) Обработанную ДНКазой РНК использовать для синтеза кДНК. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты: 4 мкл 5X реакционного буфера, 1 мкл смеси случайных гексамерных праймеров, 1 мкл ингибитора РНКазы, 2 мкл 10 мМ смеси дезоксирибонуклеотидов, 1 мкл обратной транскриптазы, 2 мкл РНК (обработанной ДНКазой) и

9 мкл стерильной воды, не содержащей нуклеаз. Инкубировать 5 мин при 25 °С, затем 1 ч при 42 °С. Полученный раствор кДНК может храниться на –20 °С.

ПЦР анализ

10) В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл: БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color – 25 мкл, прямой и обратный праймер (конечная концентрация каждого 1 нМ), ДНК-матрица (количество 0,2–1 мкг), стерильная вода (до 50 мкл). Замешивать реакционные смеси для ПЦР следует в пробирках, помещенных в лед. Осторожно перемешать реакционную смесь и сбросить капли, используя центрифугу.

11) Прогреть термоциклер до 95 °С и быстро переместить в него готовую реакционную смесь. Провести ПЦР в следующих условиях: предварительная денатурация – 95 °С 5 мин, денатурация – 95 °С 30 с, отжиг 58 °С 30 с, элонгация – 72 °С 1 мин, финальная элонгация – 72 °С 5 мин. Количество циклов 35. Все последовательности праймеров и соответствующая информация о них приведена в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Праймеры для тестирования ПСК и ЭТ мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР

Название гена	Прямой праймер, 5'→3'	Обратный праймер, 5'→3'
Sox17	TTTGTGTATAAGCCCGAGATGG	AAGATTGAGAAAACACGCATGAC
Foxa2	TGGCTGCAGACACTTCCTACT	CAACATCAGTACAACCCTCTGGT
Transferrin	TCCTGCTGATTCCGAATG	TGGCACAGGAACACTTTG
Brachyury	AACTTTCCTCCATGTGCTGAGAC	TGACTTCCCAACACAAAAAGCT
Goosecoid	ATGCTGCCCTACATGAACGT	CAGTCCTGGGCCTGTACATT
Nestin	CTCTCCCTGACTCTACTCCCT	CATCTTCTTCCTCTCCCTCTT
Neurofilament	GGAAAATGAACTTCGGGG	GAGGGCTGTCGGTGTGTG
Nanog	AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG	CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG
Sox2	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA
Oct4	CTCGAACCACATCCTTCTCT	GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC
Esg1	GAAGTCTGGTTCCTTGGCAGGATG	ACTCGATACTGGCCTAGC
Rex1	ACGAGTGGCAGTTTCTTCTTGGGA	TATGACTCACTTCCAGGGGGCACT
Actin	ACGCACGATTTCCCTCTCAGC	GGCCCAGAGCAAGAGAGGTATCC

12) Поместить агарозный гель в камеру для электрофореза. Нанести по 8–10 мкл полученными ДНК-образцов в карманы агарозного геля. Для определения размеров амплифицированных продуктов нанести ДНК-маркер 100–1500 пар оснований.

13) Провести горизонтальный гель-электрофорез при напряжении 5 В/см². Зафиксировать результаты ПЦР при помощи гель-документирующей системы.

В ПСК должны экспрессироваться гены-маркеры плюрипотентности: *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Esg1* и *Rex1* [1]. В полученных из ПСК ЭТ должна быть экспрессия молекулярных маркеров всех трех зародышевых листков: *Nestin*, *Neurofilament* – маркеры эктодермы, *Brachyury*, *Goosecoid* – маркеры мезодермы, *Sox17*, *Foxa2*, *Transferrin* – маркеры энтодермы. *Actin* – ген домашнего хозяйства, используется в качестве контроля.

При подготовке СОП «Идентификация и характеристика клеточных линий мыши и животных» использованы следующие литературные источники:

1 Menzorov A., Pristyazhnyuk I., Kizilova H., Yunusova A., Battulin N., Zhelezova A., Golubitsa A., Serov O. Cytogenetic analysis and Dlk1-Dio3 locus epigenetic status of mouse embryonic stem cells during early passages // *Cytotechnology*. 2016. 68(1). 61–71.